

A13

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

004269788

WPI Acc No: 1985-096666/198516

XRAM Acc No: C85-042043

Antibacterial homoserine-lactone derivs. prepn. - by reacting homoserine  
lactone a fatty acid

Patent Assignee: MITSUBISHI GAS CHEM CO INC (MITN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No   | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|-------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 60045568 | A    | 19850312 | JP 83153621 | A    | 19830823 | 198516 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 83153621 A 19830823

Patent Details:

| Patent No   | Kind | Lan Pg | Main IPC | Filing Notes |
|-------------|------|--------|----------|--------------|
| JP 60045568 | A    | 6      |          |              |

Abstract (Basic): JP 60045568 A

In the prepn. of homoserine-lactone derivs. of formula (I); (where R-C(O)- is a fatty acid residue), homoserine-lactone is reacted with a fatty acid. Pref. homoserine-lactone is of formula (II), and is obtd. from Methanomonas, Thiobacillus, Protaminobacter, Paracoccus or Pseudomonas bacteria.

USE/ADVANTAGE - The process gives the derivs. (I) having antibacterial activity, e.g. against Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, etc.

0/0

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-45568

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)3月12日

C 07 D 307/32

6640-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ホモセリンラクトン誘導体の製造法

⑯ 特 願 昭58-153621

⑰ 出 願 昭58(1983)8月23日

⑱ 発 明 者 梶 山 士 郎 新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟  
研究所内

⑲ 発 明 者 田 原 寅 一 新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟  
研究所内

⑳ 発 明 者 玉 野 明 新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟  
研究所内

㉑ 出 願 人 三菱瓦斯化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

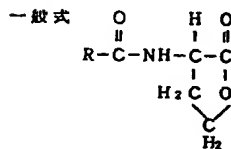
# 明 細 書

## 1 発明の名称

ホモセリンラクトン誘導体の製造法

## 2 特許請求の範囲

ホモセリンラクトンと脂肪酸とを反応させて、



〔ただし、式中  $\text{R}-\text{C}-$  は反応原料として使  
用された脂肪酸に由来する脂肪酸残基〕

で示されるホモセリンラクトン誘導体の製造法

## 3 発明の詳細な説明

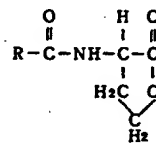
本発明はホモセリンラクトン誘導体の製造法  
に関する。

ホモセリンラクトン誘導体の一部の存在は知  
られてはいるが、その製造法は知られていない。

本発明者らは、ホモセリンラクトン誘導体に

ついて鋭意研究を重ねた結果、特異的な生理  
活性を有するホモセリンラクトン誘導体の製  
造法を発見し、本発明の方法に到達した。

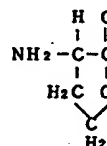
すなわち、本発明は、ホモセリンラクトン  
と脂肪酸とを反応させて一般式



〔ただし、 $\text{R}-\text{C}-$  は反応原料として使  
用された脂肪酸に由来する脂肪酸残基〕

で示されるホモセリンラクトン誘導体の製造  
法である。

ホモセリンラクトンは



で示される化合物であつて、2-アミノ-4-ブタノリドとも称されている。このホモセリンラクトンはたとえば一般にメタノール質化性微生物のような微生物の菌体に含有されている。メタノール質化性微生物には特に制限はないが、通常はたとえばメタノモナス属、チオバチルス属、プロタミノバクター属、パラコッカス属およびシュードモナス属のそれぞれに属するメタノール質化性細菌が使用される。このメタノール質化性細菌の代表例として、たとえばメタノモナス メチロボラ (Methanomonas methylovora) ATCC 21369、チオバチルス ノベルス (Thiobacillus novellus) ATCC 8093、プロタミノバクター ルバー (Protaminobacter ruber) IFO 3708、パラコッカス デニトリフィカンス (Paracoccus denitrificans) IFO 13301 およびシュードモナス メタノリカ (Pseudomonas methenolica) ATCC 21704 などがある。なお、上記において "ATCC" は "American Type Culture Collection" を示し、また "IFO" は "Institute for

Fermentation, Osaka List of culture" を示す。

これらのメタノール質化性細菌は、メタノール単独またはメタノールとたとえば糖類のような他の炭素源とを炭素源として含有する培地を使用して常法により培養される。

またメタノール質化性微生物菌体からのホモセリンラクトンの抽出は、これらの菌体を破砕しまたは破砕することなしに、たとえば、メタノール、エタノール、イソプロパノールおよびブタノールなどの低級アルコール、アセトン、ベンゼンならびにトルエンなどの有機溶媒を抽出剤として行なわれる。

また、合成法または半合成法で得られたホモセリンラクトンも使用することができる。

本発明で使用される脂肪酸として  $R-COOH$  で示される脂肪酸が使用され、飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のいずれをも使用しうる。飽和脂肪酸としては、たとえば  $R-COOH$  において  $R$  は  $C_nH_{2n+1}$  (ただし、 $n$  は3乃至29の整

数)の化合物であつて、その具体例としては脂肪酸、カブロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ペヘニン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、モンタン酸、ノリシン酸等がある。また、不飽和脂肪酸としては、たとえば  $R-COOH$  において  $R$  は  $C_nH_{2n-2m+1}$  (ただし、 $n$  は13乃至19の整数、 $m$  は2重結合の数であつて1乃至4の整数)の化合物であつてその具体例としては、ミリストオレイン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、パルセリン酸、エイコセン酸、エルシン酸、セラコレン酸、リノール酸、ヒラゴン酸、リノレン酸およびアラキドン酸等がある。

微生物菌体から抽出されたホモセリンラクトンは通常は脂質を伴っているため、この脂質は反応に先立つて除去されなければならないが、通常はこのホモセリンラクトンをヘキサンとエーテルで逐次洗浄した後、たとえば  $2N NaOH$  水溶液で加水分解し冷却後不純物を尹過しホモ

セリンラクトン水溶液を得る。このホモセリンラクトンを酸で中和し、または中和することなしに反応に供する。

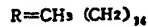
本発明の反応において水が副生するが、この副生水を除去しつつ反応を進めなければならない。そのためには水と共沸しうる溶剤たとえばクロロホルムまたは酢酸エチルを加えて共沸温度で反応をすすめる。なお、本発明での反応自体は常温乃至は室温でも進行する。前記の共沸溶剤のうち水に対する溶解度が小さいものが好ましい。共沸溶剤の使用量は少なくとも副生水を共沸物として除去するのに必要な量であり、一方、反応物中の水の全量を共沸物として除去するのに必要な量より多くしてもよい。

脂肪酸の使用量には特に制限はないが、通常はホモセリンラクトン誘導体1モルあたり1モル以上が好ましく1〜3モルが特に好ましい。

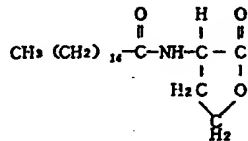
このようにして得られた反応生成物に、水および共沸溶剤が含まれる場合には、反応生成物からこの水および共沸溶剤を除去し、得られた

粗ホモセリンラクトン誘導体をたとえばメタノールから再結晶してホモセリンラクトンが得られる。

本発明で得られる代表的なホモセリンラクトン誘導体の理化学的性状はつぎの通りである。



構造式 (N-hexadecanoyl-homoserinelactone)



- 1) 元素分析値 (%)  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_3$   
 計算値 C 70.80 H 10.91  
 N 4.13 O 14.16  
 実測値 C 70.86 H 11.06  
 N 4.09 O 13.65
- 2) 分子量  
 339 (質量スペクトルによる)

- 3) 融点  
 137~138℃
- 4) 紫外線吸収スペクトル  
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} \quad 205\text{m}\mu \quad (\epsilon=58.00)$
- 5) 赤外線吸収スペクトル (KBr 法による)  
 第1図
- 6) 核磁気共鳴吸収スペクトル  
 第2図  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル  
 第3図  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
 溶媒 重クロロホルム ( $\text{CDCl}_3$ )  
 レファレンス テトラメチルシラン  
 スペクトルの幅 第2図では 5000 Hz  
 第3図では 900 Hz

- 7) 溶解度  
 メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、クロロホルムに可溶。  
 エーテル、ヘキサンには難溶、水には不溶。
- 8) 結晶の色および性状  
 白色針状結晶 (アセトンから再結晶したもの)

の)

本発明により、有用な化合物であるホモセリンラクトン誘導体が容易に得られるようになった。また本発明のホモセリンラクトン誘導体は、一般に特異な生理活性を有し、農薬または医薬として使用しうる可能性がある。

#### 実施例

純水 1ℓ あたり  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  30mg、 $\text{FeC}_5\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5g およびビタミン混合液 1ml を溶解し、pH が 6.5 に調整された液 5ℓ を 10ℓ 容培養槽に入れ、120℃で20分間殺菌した後、メタノール 50g を無菌的に添加し、これを培地とした。

なお上記のビタミン混合液の組成は

|             |      |
|-------------|------|
| ビオチン        | 20μg |
| パントテン酸カルシウム | 4mg  |

|           |        |
|-----------|--------|
| 葉酸        | 20μg   |
| イノシトール    | 20mg   |
| ニコチン酸     | 4mg    |
| ピリドキシン塩酸塩 | 4mg    |
| チアミン塩酸塩   | 4mg    |
| p-アミノ安息香酸 | 2mg    |
| リボフラビン    | 2mg    |
| 純水        | 1000ml |

である。

これに前記と同様な培地を用いて30℃で48時間前培養されたペラコフカス デニトリフィカンス (IFO 13301) の菌体を含む前培養液 1.5 容を接種し、培養期間中の培養液の pH が 6.5 に維持されるようにアンモニア水を補給しながら培養温度 30℃、攪拌回転数 700 rpm、通気量 1vvm で通気攪拌培養を行なった。12時間の増殖誘導期間の後、対数増殖期となり対数増殖期では世代時間 3.5 時間で増殖し、培養開始 48 時間後に培養液のメタノール濃度は 0.001 wt% 以下となつ

た。この培養液を遠心分離して菌体を分離回収し、この菌体を100℃で10時間乾燥して培養液1gあたり2.8gの乾燥菌体を得た。

この菌体14gにアセトン200mlを加え、50℃、5時間攪拌下で抽出し、フィルターにて除菌後、ホモセリンラクトンを含む抽出液を得た。次に抽出液を-20℃、20時間冷却し、析出したホモセリンラクトンを含む油状物質を採取し、ヘキサン100mlとエーテル100mlとで逐次洗浄後、白色粉末を得た。

温度計、冷却管を備えた400ml三口フラスコに、この白色粉末および2N NaOH水溶液100mlを加え90℃で1時間加熱した。冷却後不純物を採取し、ホモセリンラクトン 2.1gを含む水溶液を得た。

ホモセリンラクトンを含む水溶液をHClでpH 7.0に中和後、温度計、分液漏斗と接続した冷却管を備えた400ml三口フラスコにつし、クロロホルム 100ml、ペルメタン酸 6gを加え、水・クロロホルムの共沸温度

56.1℃で2時間加熱保持した。

なお、加熱中蒸留分は冷却され、クロロホルムは分液漏斗で水とわけフラスコ内にもどし、水は系外に取り出した。

最後に、ホモセリンラクトン誘導体を含むクロロホルム溶液を濃縮乾燥し、メタノールより再結晶して白色針状結晶品ホモセリンラクトン誘導体 7gを得た。

この物質はつぎの性質を示した。

元素分析値  $C_{22}H_{37}NO_3$

C 70.86 H 11.06

N 4.09 O 13.65

分子量 339 (質量スペクトルによる)

融点 137~138℃

紫外線吸収スペクトル

$\lambda_{CH_3OH}^{max}$  205m $\mu$  ( $\epsilon=58.00$ )

赤外線吸収スペクトル (KBr法)

第1図と一致した。

核磁気共鳴スペクトル

第2図および第3図のそれぞれと一致した。

次に本発明化合物の抗菌作用を明らかにする試験例を示す。

#### 試験例

寒天稀釈法により各種試験菌に対する最小生育阻止濃度(MIC)を測定し、第1表の結果を得た。

尚、表中の化合物Aは、次の通りであつた。

#### 化合物A 1

$R=CH_3(CH_2)_{12}$

分子式  $C_{19}H_{39}NO_3$

N-tetradecanoyl-homoserinelactone

白色, mp 118~119℃

#### 化合物A 2

$R=CH_3(CH_2)_{14}$

分子式  $C_{20}H_{41}NO_3$

N-hexadecanoyl-homoserinelactone

白色, mp 137~138℃

#### 化合物A 3

$R=CH_3(CH_2)_{16}$

分子式  $C_{22}H_{41}NO_3$

N-octadecanoyl-homoserinelactone

白色, mp 154~155℃

#### 化合物A 4

$R=CH_3(CH_2)_7CH:CH(CH_2)_7$  cis体

分子式  $C_{22}H_{39}NO_3$

N-cis-9-octadecenoyl-homoserinelactone

無色, mp 34~35℃

#### 化合物A 5

$R=CH_3(CH_2)_9CH:CH(CH_2)_5$  trans体

分子式  $C_{22}H_{39}NO_3$

N-trans-7-octadecenoyl-homoserinelactone

無色, mp 96~97℃

#### 化合物A 6

$R=CH_3(CH_2)_4CH:CHCH_2CH:CH(CH_2)_7$  cis体

分子式  $C_{22}H_{39}NO_3$

N-cis-8, cis12-octadecadecadienoyl-homoserinelactone

無色, mp 18~19℃

第 1 表

| 順 名  | IFO<br>No. | 菌 類 性 質 など | 培 地 | 化 合 物 |      |      |      |      |      |
|--|------------|------------|-----|-------|------|------|------|------|------|
|  |            |            |     | Ag 1  | Ag 2 | Ag 3 | Ag 4 | Ag 5 | Ag 6 |
| 1 Staphylococcus aureus<br>スチフィロコッカス・アウレウス       | 2732       | 黄色ブドウ球菌    | A   | 6.25  | 6.25 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 0.78 |
| 2 Bacillus subtilis<br>バシラス・スブチリス                | 3513       | 枯草菌        | A   | 3.13  | 3.13 | 3.13 | 12.5 | 12.5 | 3.13 |
| 3 E. coli<br>エシェリヒア・コリ                           | 3301       | 大腸菌        | A   | 25    | 50   | 50   | 0.78 | 0.78 | 0.78 |
| 4 Xanthomonas oryzae<br>キサントモナス・オリザ              | 3312       | イネ白葉枯病菌    | C   | 12.5  | 12.5 | 12.5 | 6.25 | 0.78 | 0.78 |
| Xanthomonas citri<br>キサントモナス・シトリ                 | 3781       | 柑桔実腐病菌     | C   | 12.5  | 12.5 | 12.5 | 25   | 12.5 | 25   |
| Erwinia carotovora<br>エリウィニア・カロトボラ               | 3830       | モモ軟腐病菌     | C   | 12.5  | 12.5 | 12.5 | 25   | 12.5 | 25   |
| Mycobacterium phlei<br>マイコバクテリウム・フライ             | 3158       | 抗酸性菌       | C   | 3.13  | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 3.13 |
| Trichophyton mentagrophytes<br>トリコフィトン・メンタグロフィテス | 5810       | 水虫菌        | B   | 1.56  | 1.56 | 1.56 | 6.25 | 6.25 | 6.25 |
| Trichophyton rubrum<br>トリコフィトン・ルブルム              | 5467       | "          | B   | 1.56  | 1.56 | 1.56 | 6.25 | 6.25 | 6.25 |
| Alternaria mali<br>アルナリア・マリ                      | 8984       | リンゴ斑点落葉病菌  | C   | 12.5  | 50   | 50   | 12.5 | 12.5 | 12.5 |
| Glomerella lagenarium<br>グロメラリア・ラゲナリウム           | 7513       | キュウリ炭疽病菌   | C   | 6.25  | 6.25 | 6.25 | 12.5 | 12.5 | 12.5 |
| Pyricularia oryzae<br>ピリカルリア・オリザ                 | 5994       | イネいもち病菌    | C   | 12.5  | 50   | 50   | 6.25 | 12.5 | 12.5 |
| Botryotinia fuckeliana<br>ボトリオティニア・フッケリアナ        | 5365       | 果樹灰色カビ病菌   | C   | 12.5  | 50   | 50   | 1.56 | 12.5 | 12.5 |
| Candida albicans<br>カンジダ・アルビカンス                  | 1594       | カンジダ菌      | B   | 0.78  | 1.56 | 1.56 | 0.78 | 0.78 | 0.78 |

培地 A: プレン・ハート・インフュージョン寒天 B: サッロー寒天 C: ポット・グルコース寒天

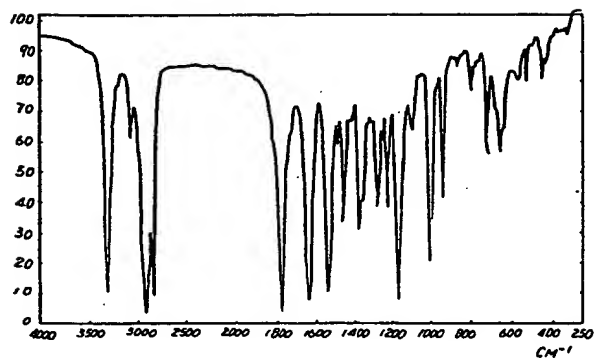
測定 1~7、14: 酵母: 接種24時間後、8~13: 検体1週間後

## 4 図面の簡単な説明

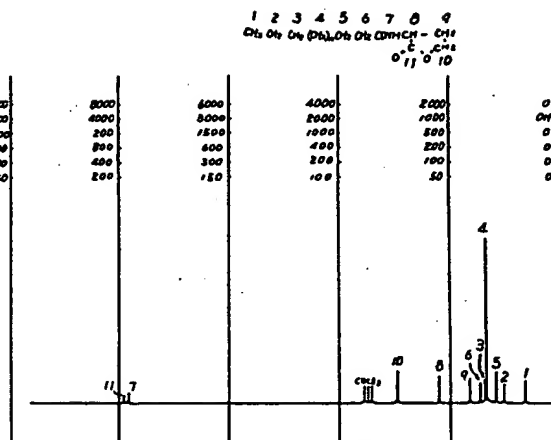
第1図ならびに第2図および第3図は、それ  
それ本発明のホモセリナクトン誘導体の代表  
例であるN-hexadodecanoyl-homoserine-  
lactoneの赤外線吸収スペクトルならび  
に核磁気共鳴スペクトルである。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社  
代表者 長 野 和 吉

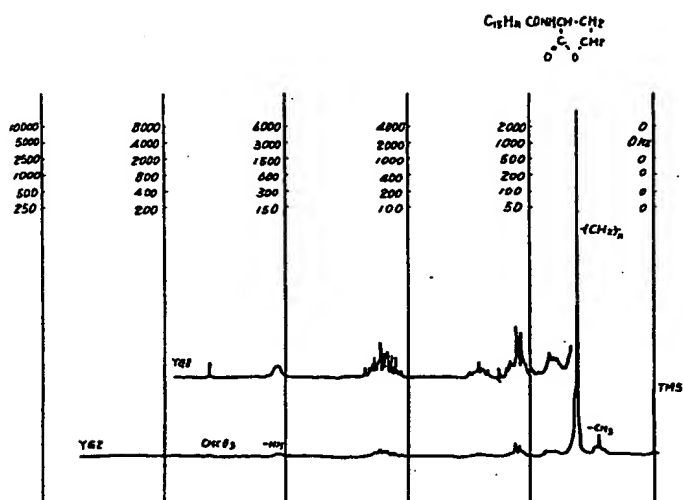
第 1 回



第2回



### 第3回



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**